

Variability of antioxidant defense enzymes in primary angle closure glaucoma patients in comparison with healthy subjects

Shahsavari G¹, Mohammad pour Konani A², Miraftabi A^{3*}

1- Department of Clinical Biochemistry, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

2- Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

3- Glaucoma Research Center, Hazrat Rasool Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 17 Nov 2014, Accepted: 7 Jan 2015

Abstract

Background: Oxidative stress and antioxidant status may be associated with glaucomatous damage.

The purpose of this study was comparison of the serum antioxidant status between primary angle closure glaucoma patients and healthy subjects.

Materials and Methods: In this case- control study 66 primary angle closure glaucoma patients and 80 controls were enrolled. Peripheral blood sample obtained from patients. Superoxide dismutase(SOD) was assayed by inhibition the rate of adrenochrome formation. Catalase (CAT) was evaluated by decrease of H₂O₂ absorbance. Glutathione peroxidase (GPx) and Glutathione reductase (GR) were determined following NADP oxidation or reduction. Glutathione S-transferase (GST) was measured by increase in the absorbance of CDNB and glutathione conjugation.

Results: Antioxidant defense enzymes were significantly decreased in glaucoma patients over those of control groups. CAT (p<0.006), SOD (p<0.020) and GPX (p<0.004). A relative insignificant decrease of GR and GST activities was observed in glaucoma patients compared with healthy subjects.

Conclusion: The present study supports the hypothesis that oxidative stress is an important factor in the pathogenesis of glaucoma. Although primary angle closure glaucoma has an anatomical basis but decrease in antioxidant defense enzymes activities may have a role in pathogenesis of this type of glaucoma.

Keywords: Antioxidant Enzymes, Primary Angle Closure Glaucoma, Oxidative Stress

*Corresponding Author:

Address: Eye Research Center, Rasoul Akram Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: arezoomiraftabi@yahoo.com

تغییرات آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدان در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد سالم

غلامرضا شهسواری^۱، اصغر محمدپور کوفانی^۲، آرزو میر آفتابی^{۳*}

۱- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات گلوکوم، بیمارستان حضرت رسول، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: استرس اکسیداتیو وضعیت آنتی‌اکسیدانی سرمی ممکن است در شکل‌گیری و آسیب‌زایی بیماری گلوکوم موثر باشد. تغییر پروفایل اکسیدان/آنتی‌اکسیدان سرمی در پاتولوژی‌های چشمی گزارش شده است. این مطالعه جهت ارزیابی مقایسه‌ای تغییرات فعالیت آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدان در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته و افراد سالم صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع مورد-شاهدی و مشتمل بر ۶۶ بیمار مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته و ۸۰ فرد گروه کنترل بود. نمونه خون محیطی از بیماران گرفته شد. آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، به واسطه مهار میزان تشکیل آدرنوکروم مورد سنجش قرار گرفت. کاتالاز (CAT) از طریق کاهش جذب H_2O_2 ارزیابی شد. گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) متعاقب اکسیداسیون یا احیاء NADP تعیین گردید. گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) به واسطه افزایش جذب کزنوگه شدن CDNB با گلوتاتیون اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در زمینه فعالیت آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدان گلوبول‌های قرمز خون، یک کاهش معنی‌دار در CAT ($p < 0.006$)، SOD ($p < 0.020$) و GPX ($p < 0.004$) بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد گروه کنترل مشاهده شد. فعالیت GR و GST بیماران مبتلا به گلوکوم در قیاس با افراد سالم از کاهش نسبی معنی‌داری برخوردار نبود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه فرضیه نقش مهم استرس اکسیداتیو در بیماری گلوکوم را تایید میکند. گرچه گلوکوم زاویه بسته بیشتر یک اساس اناتومیکی دارد اما کاهش قابل ملاحظه فعالیت آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدان می‌تواند نقشی در ایجاد این نوع گلوکوم داشته باشد.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، گلوکوم اولیه زاویه بسته، استرس اکسیداتیو

*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان حضرت رسول، مرکز تحقیقات گلوکوم

Email: miraftaboo@yahoo.com

مقدمه

استرس اکسیداتیو در گسترش آسیب‌زایی بسیاری از بیماری‌ها دخالت دارد. استرس اکسیداتیو به واسطه تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن نقش عمده‌ای در بروز و گسترش بیماری‌های چشمی نظیر کاتاراکت، رتینوپاتی، گلوکوم اولیه زاویه باز و گلوکوم اکسفلیاتیو کاذب دارد. بیماری گلوکوم یا آب سیاه، یک بیماری چندعاملی بوده که ناشی از مسایل ژنتیکی، محیطی یا ثانویه دیگر بیماری‌های چشمی است و گستره‌ای از آسیب‌های مکانیکی منتهی به افزایش فشار درون چشم را در برمی‌گیرد. گلوکوم به گروه ناهمگنی از بیماری‌های چشم اطلاق می‌گردد که با کاپینگ سر عصب بینایی، تخریب این عصب و طرح خاصی از کاهش میدان دید ظاهر می‌شود. گلوکوم به عنوان شایع‌ترین بیماری نوروپاتیک بینایی در انسان و دومین عامل نابینایی در سراسر جهان شناخته شده است. این بیماری می‌تواند به انواع گلوکوم اولیه، ثانویه و پیشرفته تقسیم شود. سه زیر گروه اصلی گلوکوم شامل گلوکوم اولیه زاویه باز، گلوکوم اولیه زاویه بسته و گلوکوم وراثتی است. شواهد رو به افزایش، بیان‌گر نقش کلیدی گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن ناشی از استرس اکسیداتیو و یا ضعف سیستم دفاع آنتی اکسیدان در پاتوژن بیماری گلوکوم می‌باشد (۱).

رادیکال‌های آزاد به طور مداوم در نتیجه فرآیندهای طبیعی متابولیک و در تعادل با تحرکات محیطی در بدن تولید می‌شوند. استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین سیستم‌های تولید کننده و به دام اندازنده رادیکال آزاد بوده که با افزایش تولید رادیکال آزاد یا کاهش فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و یا هر دو همراه می‌باشد. سیستم دفاع آنتی اکسیدانی، به دو دسته تقسیم‌بندی می‌شود: ۱- آنتی اکسیدان‌های آنزیمی، ۲- آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی. دفاع آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی، شامل مولکول‌های کوچک نظیر ویتامین E، اسکوربات و گلوکاتینون می‌باشد و دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی سلول مشتمل بر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)،

گلوکاتینون پراکسیداز (GPX)، گلوکاتینون ردوکتاز (GR) و گلوکاتینون S - ترانسفراز (GST) است (۲، ۳). گلوکوم اولیه زاویه بسته حاد هنگامی رخ می‌دهد که برجستگی به اندازه‌ای در عنیبه ایجاد شود که باعث انسداد زاویه اتاق قدامی توسط عنیبه محیطی شود. این انسداد موجب کاهش خروج مایع زلالیه و افزایش سریع فشار داخل چشم می‌شود که با ایجاد درد، قرمزی و تاری دید همراه است (۴). افزایش فشار داخل چشم یک عامل خطر برای ابتلا به بیماری گلوکوم است که می‌تواند در نتیجه آسیب اکسیداتیو ناشی از گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن ایجاد شود (۵). تغییرات عروقی که اغلب در گلوکوم دیده می‌شود، در نتیجه آسیب اکسیداتیو ناشی از افزایش استرس اکسیداتیو هم در شبکه ترابکولار و هم در سلول‌های شبکه صورت می‌گیرد (۶). شبکه ترابکولار از مکانیسم‌های موثری جهت برداشتن گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن نظیر غلظت‌های بالای گلوکاتینون احیاء، و فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز برخوردار است (۷). علاوه بر این بافت‌های دیگر نیز ممکن است برای حذف گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در مایع زجاجیه شرکت کنند. گلوکاتینون پراکسیداز در مایع زجاجیه یافت شده و اعتقاد بر این است که منشا ژن عمدتاً اپیتلیوم سیلاری است. شواهد آزمایشگاهی موجود قویاً نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو یک نقش کلیدی در تغییرات آسیب‌زایی شبکه ترابکولار بیماران گلوکوم دارد (۸). پتانسیل تام واکنشگر آنتی اکسیدان در مایع زجاجیه بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه باز در قیاس با بیماران مبتلا به کاتاراکت به طور معنی‌دار کاهش می‌یابد، در حالی که فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتینون پراکسیداز در مایع زجاجیه بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه باز در قیاس با این بیماران افزایش پیدا می‌کند (۹). هم‌چنین یک کاهش معنی‌دار در شاخص‌های ظرفیت تام آنتی اکسیدان پلاسما و مالون دی‌آلدئید به عنوان نشان‌گر پراکسیداسیون لیپیدی در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه باز در مقایسه با افراد کنترل مشاهده می‌شود، این در حالی است که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه

افراد سالم ۵/۱۰±۵۲ سال بود. ۱۱ درصد از بیماران مبتلا به گلوکوم و ۶ درصد از افراد سالم سابقه مصرف سیگار داشتند. گروه بیماران و گروه کنترل از لحاظ سن، جنس، نژاد (ایرانی بودن) و وضعیت مصرف سیگار کاملاً با یکدیگر همسان شدند. معیار ورودی گروه کنترل به این مطالعه در برگزیده افرادی بود که فاقد گلوکوم یا هر نوع اختلالی بودند که به نفع بیماری گلوکوم است، نظیر بیماری های مرتبط با چشم، رتین، عدسی و مشکلات مرتبط با بینایی. هم چنین افراد گروه کنترل می بایست فاقد بیماری سیستمیک نظیر دیابت شیرین فشار داخلی چشم کمتر از ۲۱ میلی متر جیوه و دارای حدت بینایی بیش از ۲۰/۴۰ باشند. گروه کنترل از نظر سن و جنس با گروه بیماران همسان بود. از تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه قبل از ورود به بررسی و گرفتن نمونه خون، رضایت نامه کتبی و آگاهانه اخذ گردید. بر اساس رای کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه علوم پزشکی لرستان با کد اخلاقی ۲۰۰/۴۱۵۳۳ و مشروط به اخذ رضایت کتبی و آگاهانه از افراد مورد مطالعه و حفظ راز داری، با انجام این طرح موافقت شد.

جمع آوری نمونه

۵ میلی لیتر خون وریدی از هر یک از افراد مورد مطالعه به لوله حاوی هپارین انتقال داده شد و پس از سانتریفوژ نمودن، پلاسما آن جدا گردید. پلاسما به سرعت به فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد منتقل شده و تا زمان انجام آزمایش در آن نگهداری شد. اریتروسیت های حاصل، دو بار با بافر فسفات حاوی کلرید سدیم با دمای ۴ درجه سانتی گراد (یک حجم بافر فسفات با PH=۷/۴ به اضافه ۹ حجم کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار) شسته شدند. این اریتروسیت های شسته شده پس از سانتریفوژ نمودن بلافاصله به فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد منتقل گردیدند.

تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم CAT در گلوبول های قرمز با استفاده از روش به کار گرفته شده توسط جوآنسون و بارک سنجیده می شود که در این روش سرعت تجزیه سوبسترای H₂O₂ در طول موج ۲۴۰ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر

باز در قیاس با بیماران مبتلا به گلوکوم اکسفلیاتیو کاذب و گروه کنترل به طور معنی دار افزایش می یابد (۱۰). به علاوه تغییرات گلوکوتاتیون و فعالیت آنزیم های وابسته در لنز، قرنیه، رتین و دیگر بافت های چشم در پیری، کاتاراکت و دیابت گزارش شده است (۱۱).

از این رو نتایج مطالعات متعدد یاد شده در زمینه تغییر پروفایل اکسیدان- آنتی اکسیدان در پاتولوژی های چشمی، به ویژه در خصوص بیماری گلوکوم اولیه زاویه باز انتشار یافت. با توجه به مکانیسم آسیب زایی که به واسطه اختلال آناتومیک منجر به افزایش فشار داخل چشم و آسیب عصب بینایی در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته می شود، این ارزیابی جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم های دفاع آنتی اکسیدان مشتمل بر GPX، SOD، CAT، GR و GST در گلوبول های قرمز بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد سالم صورت می گیرد که در سمیت زدایی و خنثی سازی گونه های واکنش گر اکسیژن و رادیکال های آزاد مخرب نقش دارند.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه

این مطالعه از نوع مورد- شاهدی است و براساس بررسی متون صورت گرفته است. با تعیین مقدار α برابر با ۰/۰۵، مقدار β برابر با ۰/۲ (توان ۸۰ درصد) و رابطه $n = [(Z_{1-\alpha/2})^2 + (Z_{1-\beta})^2] (S_1^2 + S_2^2) / d^2$ که S انحراف معیار گروه های مورد مطالعه و d حداقل اختلاف مورد انتظار برای معنی دار بودن فاکتور مورد اندازه گیری است، حداقل نمونه مورد نیاز ۶۲ مورد محاسبه گردید (۹).

جمعیت مورد مطالعه در این بررسی تعداد ۶۶ نفر بیمار مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته مشتمل بر ۴۶ درصد مرد و ۵۴ درصد زن بود که به بخش چشم بیمارستان های فارابی و رسول اکرم (ص) تهران مراجعه کرده بودند. هم چنین ۸۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل (۴۷ درصد مرد) و (۵۳ درصد زن) تحت بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران مبتلا به گلوکوم ۵۸/۴±۱۱/۷ سال و میانگین سنی

تعیین فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز

اندازه گیری فعالیت آنزیم GR در گلبول‌های قرمز با روش به کار رفته توسط کارلبری و منیرویگ و مطابق با دستورالعمل کیت شرکت راندوکس ساخت کشور انگلستان صورت پذیرفت. در این روش، گلوکاتایون ردوکتاز، فرم اکسید گلوکاتایون (GSSG) را ضمن اکسیداسیون NADPH به فرم احیای گلوکاتایون (GSH) تبدیل می‌کند. فعالیت کاتالیتیکی آنزیم با اکسیداسیون NADPH به $NADP^+$ که با کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر همراه است صورت می‌پذیرد (۱۵).

تعیین فعالیت آنزیم گلوکاتایون S- ترانسفراز

اندازه گیری فعالیت آنزیم GST در گلبول‌های قرمز با روش به کار رفته توسط جاکوبای و مطابق با دستورالعمل کیت شرکت کایمن کمیکال ساخت کشور امریکا، صورت پذیرفت. در این سنجش فعالیت آنزیم گلوکاتایون S- ترانسفراز به واسطه اندازه گیری افزایش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در نتیجه کنژوگه شدن CDNB (۱ کلو و ۲ و ۴ دی نیتروبنزن) با گلوکاتایون احیاء انجام پذیرفت (۱۶).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. ارزیابی مقایسه میانگین متغیرهای کمی بین گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون تی استیودنت مستقل صورت پذیرفت. تمام آزمون‌ها به صورت دو طرفه و با سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی شدند. مقادیر $p \leq 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز گلبول‌های قرمز خون، به عنوان عامل خنثی کننده پراکسید هیدروژن و پراکسیدهای آلی، در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد طبیعی به طور معنی داری کاهش می‌یابد. در حالی که فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز به عنوان عامل احیاء کننده کوآنزیم NADP گلبول‌های قرمز خون این بیماران در قیاس با افراد گروه کنترل کاهش نسبی

اندازه گیری می‌شود. در این روش هیدروژن پراکسید به وسیله کاتالاز به آب و اکسیژن تجزیه می‌گردد (۱۲). پس از محاسبه غلظت هموگلوبین نمونه‌های همولیزات (گرم بر میلی‌لیتر)، فعالیت آنزیم کاتالاز به صورت «ثابت سرعت واکنش بر گرم هموگلوبین» ($K/gr Hb$) بیان گردید.

تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

اندازه گیری فعالیت آنزیم SOD به شیوه آنزیمی و براساس روش آرتور و بوین مطابق با دستورالعمل کیت شرکت راندوکس ساخت کشور انگلستان انجام شد. در این روش سرعت احیاء سیتوکروم C به وسیله رادیکال‌های سوپراکسید، که از طریق سیستم گزانتین - گزانتین اکسیداز تولید می‌شوند در طول موج ۵۵۰ نانومتر ثبت می‌گردد. SOD موجود در نمونه، رادیکال‌های سوپراکسید را تجزیه نموده و سرعت احیاء سیتوکروم C را کاهش می‌دهد. یک واحد SOD میزان آنزیمی است که قادر است قدرت احیاء سیتوکروم C را به میزان ۵۰ درصد (تحت شرایط ویژه) کاهش دهد. غلظت هموگلوبین نمونه‌های همولیزات (گرم بر میلی‌لیتر) و فعالیت آنزیم SOD برحسب واحد بر میلی‌لیتر اندازه گیری شد و سپس فعالیت آنزیم هر نمونه بر اساس واحد در گرم هموگلوبین محاسبه گردید (۱۳).

تعیین فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز

اندازه گیری فعالیت آنزیم GPX به صورت آنزیمی، از طریق روش ولنتاین و پاگلیا و با استفاده از کیت شرکت راندوکس ساخت کشور انگلستان، مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. در این روش، سرعت اکسیداسیون گلوکاتایون به وسیله H_2O_2 که با گلوکاتایون پراکسیداز موجود در همولیزات کاتالیز می‌گردد سنجیده می‌شود. گلوکاتایون اکسید شده حاصل، تحت اثر آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز مجدداً احیاء شده و در این حین، یک مولکول NADPH به NADP اکسیده می‌گردد. با تغییرات جذب NADPH در طول موج ۳۴۰ نانومتر می‌توان به سرعت تولید گلوکاتایون اکسیده پی‌برد (۱۴).

ترانسفراز گلبول‌های قرمز به عنوان عامل سمیت زدایی رادیکال‌های آزاد و گزنویوتیک‌ها در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد سالم، یک کاهش نسبی را نشان می‌دهد. هر چند این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نیست (جدول ۱).

را نشان می‌دهد. گرچه این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نیست. فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان از بین برنده پراکسید هیدروژن و سوپراکسید دیسموتاز به عنوان آنزیم سمیت‌زدای یون سوپر اکسید در گلبول‌های قرمز بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد سالم به طور معنی‌داری پایین‌تر بود. فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون S-

جدول ۱. مقادیر فعالیت آنزیم های دفاع آنتی اکسیدان در گلوبولهای قرمز گروه بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه بسته و گروه افراد سالم

| متغیرهای کمی | گروه بیماران گلوکوم (۶۶ نفر) | گروه افراد سالم (۸۰ نفر) | p |
|--|---------------------------------|-----------------------------|-------|
| کاتالاز (K/gr Hb) | ۹/۴۸±۲/۸۸ | ۱۱/۶۵±۳/۷۵ | ۰/۰۰۶ |
| سوپر اکسید دیسموتاز (U/gr Hb) | ۱۰۵۸/۲۹±۳۵۳/۰۵ | ۱۲۴۰/۸۹±۴۲۴/۱۱ | ۰/۰۲۰ |
| گلوکوتاتیون پراکسیداز (μmol/gr Hb) | ۵۱/۰۹±۲۷/۹۶ | ۶۸/۸۳±۳۷/۶۲ | ۰/۰۰۴ |
| گلوکوتاتیون ردوکتاز (U/gr Hb) | ۷/۲۴±۲/۴۱ | ۸/۲۰±۲/۵۴ | ۰/۶۲ |
| - گلوکوتاتیون S ترانسفراز (μmol/gr Hb) | ۶/۵۷±۲/۸۸ | ۷/۸۵±۲/۳۴ | ۰/۱۱۴ |

از دیگر یافته‌های مطالعه حاضر، کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز گلبول‌های قرمز در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد طبیعی است. در حالی که فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون ردوکتاز این بیماران در قیاس با افراد گروه کنترل کاهش نسبی غیر معنی‌داری را نشان می‌دهد. اکی والان احیاء NADPH حاصل از راه پنتوز فسفات در گلبول‌های قرمز به کمک آنزیم گلوکوتاتیون ردوکتاز، شکل اکسید شده گلوکوتاتیون را به شکل احیاء شده آن تبدیل می‌کند. کوآنزیم این آنزیم یک فلاو پروتئین حاوی فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) است. گلوکوتاتیون احیاء شده نیز متعاقباً در واکنشی به کمک آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز و در حضور عنصر سلنیوم باعث تجزیه H_2O_2 و پراکسیدهای آلی موجود در فاز چربی (محصول سوپراکسید دیسموتاز) و خنثی سازی آنها می‌گردد. این واکنش‌ها برای سلول‌ها به ویژه گلبول‌های قرمز به عنوان یکی از سدهای دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی بسیار موثر در تجزیه گونه‌های پراکسید اکسیژن، از اهمیت زیادی برخوردار دارند، زیرا گونه‌های پراکسید هیدروژن می‌توانند با افزایش سرعت اکسیداسیون عمر سلول را کاهش دهند که این مسئله بیان‌گر کاهش چشم‌گیر دفاع

فعالیت آنزیم‌ها به صورت میکرومول در دقیقه بر گرم پروتئین هموگلوبین (μmol/gr Hb)، ثابت سرعت واکنش بر گرم هموگلوبین (K/gr Hb) و یا واحد بین‌المللی بر گرم پروتئین هموگلوبین (U/gr Hb) محاسبه شده است. مقادیر متغیرها بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان می‌شود.

بحث

در مطالعه حاضر، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در گلبول‌های قرمز بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش دارد. رادیکال‌های سوپر اکسید از طریق آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به دو ترکیب با قدرت اکسید کنندگی کمتر، یعنی پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌شوند. کاتالاز یک پروتئین دارای هم است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. این یافته‌ها بیان‌گر یک کاهش قابل ملاحظه دفاع آنزیمی آنتی اکسیدان خنثی کننده پراکسید هیدروژن و سوپر اکسید اکسیژن در سلول است که متعاقب آن زمینه ساز افزایش استرس اکسیداتیو می‌باشد.

گروه تغییر معنی داری مشاهده نشد (۹). گزارشات حاکی است که استرس اکسیداتیو به عنوان یک عامل خطر جهت آسیب‌زایی بیماری گلوکوم اولیه باز مطرح است.

نتایج انتشار یافته مطالعات محققان اشاره گر نقش استرس اکسیداتیو به عنوان یک عنصر مهم در تخریب سلول‌های گانگلیونی به وسیله گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در بیماری گلوکوم است. این مطالعات نشان می‌دهد که افزایش گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و هم‌چنین کاهش فعالیت دفاع آنتی اکسیدان نقش آسیب‌زایی مهمی در این زمینه ایفا می‌کنند (۲۲). از نظر فیزیوپاتولوژی، گلوکوم با افزایش فشار داخل چشم، فرورفتگی سر عصب اپتیک و از دست دادن میدان بینایی مشخص می‌شود. فشار داخل چشم با میزان تولید مایع زلالیه و مقاومت در برابر خروج آن از چشم مشخص می‌شود. بنابراین افزایش فشار داخل چشم زمانی روی می‌دهد که تولید مایع زلالیه بیش از مقدار معمول باشد و یا در برابر خروج آن مانعی وجود داشته باشد. اگر این سد مانع رسیدن مایع زلالیه به شبکه ترابکولر شود، گلوکوم را زاویه بسته و در صورتی که ممانعتی در راه‌یابی مایع به شبکه ترابکولر ایجاد نکند آن را زاویه باز می‌نامند (۲۳).

آنزیم‌های گلوکوتاتیون S ترانسفراز در شکل‌گیری و عمل سیستم دفاعی در مقابل مواد سمی نقش عمده‌ای به عهده دارند و در واقع به عنوان فاز دوم آنتی اکسیدان مواجه با استرس اکسیداتیو محسوب می‌شوند. این آنزیم‌ها اتصال گلوکوتاتیون را از طریق گروه سولفیدریل به مراکز الکتروفیلیک در محدوده وسیعی از سوپستراها کاتالیز می‌کنند (۲۴). در این مطالعه تغییرات کاهش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون S - ترانسفراز در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد کنترل معنی دار نبود، گرچه کاهش فعالیت این آنزیم به صورت نسبی مشاهده گردید. گلوکوتاتیون S - ترانسفراز متعلق به گروه بزرگی از آنزیم‌های سمیت زدا بوده که در سلول به واسطه گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن تنظیم می‌شود و گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن آن را به صورت یک واکنشی سازشی القا می‌کنند. از این رو این

آنتی اکسیدان آنزیمی در اثر کاهش فعالیت آنزیم‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز و گلوکوتاتیون ردوکتاز در خنثی سازی گونه‌های پراکسید در فاز آبی و چربی بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته است (۱۷).

در راستای نتایج حاصل از این مطالعه، ماجستریک و همکاران، در مطالعه‌ای واقع در کشور لهستان یک کاهش معنی دار آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز را در بیماران مبتلا به گلوکوم در قیاس با نمونه‌های کنترل گزارش نمودند (۱۸). هم‌چنین در این راستا، نتایج پژوهش انژین و همکاران، در کشور ترکیه اشاره به کاهش معنی دار فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گلوبول‌های قرمز بیماران مبتلا به گلوکوم در مقایسه با افراد سالم است (۱۹).

بررسی‌های انتشار یافته محققان بر روی آنزیم‌های آنتی اکسیدان موجود در مایع زجاجیه بیماران مبتلا به گلوکوم در قیاس با بیماران مبتلا به کاتاراکت، بیان‌گر کاهش معنی دار فعالیت این سیستم دفاع آنتی اکسیدانی می‌باشد. غانم و همکاران، در یک بررسی در کشور مصر اظهار داشتند که فعالیت آنزیم‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در مایع زجاجیه بیماران گلوکوم اولیه زاویه باز در قیاس با گروه بیماران مبتلا به کاتاراکت به طور معنی داری بالاتر بود، ولیکن تغییر معنی داری در فعالیت کاتالاز مایع زجاجیه بیماران گروه گلوکوم و گروه کاتاراکت یافت نشد (۲۰). هم‌چنین نتایج پژوهش گوپال و همکاران، در کشور هندوستان به افزایش معنی دار سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز در مایع زجاجیه بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه باز و بسته در قیاس با بیماران مبتلا به کاتاراکت اشاره دارد. لیکن در این قیاس تغییر معنی داری در فعالیت کاتالاز مشاهده نگردید (۲۱). به علاوه نتایج پژوهش فریرا و همکاران، در کشور آرژنتین افزایش معنی داری را در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در مایع زجاجیه بیماران گلوکوم در قیاس با بیماران کاتاراکت نشان داد، ولی در فعالیت کاتالاز بین دو

آنزیم متابولیت های سمی تولید شده به وسیله استرس اکسیداتیو را خنثی می نماید (۲۵).

نتیجه گیری

در هر صورت، هنگامی که تعادل بین اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها بر هم خورد، به نحوی که سبب تخلیه و کمبود آنتی اکسیدان و یا تراکم زیاد گونه های واکنش گر اکسیژن شود، استرس اکسیداتیو افزایش می یابد. کاهش معنی دار میزان فعالیت آنزیم های گلوکوتایون پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد طبیعی، بیان کننده یک کاهش قابل ملاحظه در این سیستم دفاع آنتی اکسیدان آنزیمی مهم سلولی می باشد. از طرف دیگر کاهش فعالیت آنزیم هایی نظیر سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته، به استرس اکسیداتیو کنترل نشده و دفاع معیوب و غیرطبیعی سیستم مقابله با استرس اکسیداتیو دارد. بنابراین استرس اکسیداتیو اشاره اولیه ممکن است در پیامدهای متابولیک و آناتومیکی که منجر به افزایش آسیب عصب بینائی در گلوکوم می شوند، دخیل باشد. این نکته می تواند حتی در مورد گلوکومائی نظیر گلوکوم اولیه زاویه بسته که به نظر می رسد آناتومیک اولیه ای در مکانیسم آسیب عصب بینائی دارد، نیز صادق باشد. در نهایت نتایج نشان می دهد که کاهش قابل ملاحظه فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدان آنزیمی مهم سلولی در بیماران مبتلا به گلوکوم اولیه زاویه بسته در قیاس با افراد سالم، بیان گر یک نقش پاتولوژیکی در بیماری گلوکوم اولیه زاویه بسته است که به واسطه افزایش آسیب استرس اکسیداتیو از طریق گونه های واکنش گر اکسیژن صورت می گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی لرستان جهت انجام این طرح تحقیقاتی به شماره ۱۱۴۲ تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Sacca SC, Izzotti A, Rossi P, Traverso C. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Experimental eye research*. 2007; 84(3): 389-99.
2. Engin KN. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular vision*. 2009;15:855-6.
3. Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011;155(Suppl 2):131-6.
4. Izzotti A, Saccà SC, Cartiglia C, De Flora S. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients. *The American journal of medicine*. 2003;114(8):638-46.
5. Moreno MC, Campanelli J, Sande P, Sáenz DA, Sarmiento MIK, Rosenstein RE. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 37(6):803-12.
6. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2006; 612(2): 105-14.
7. Freedman SF, Anderson PJ, Epstein D. Superoxide dismutase and catalase of calf trabecular meshwork. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1985; 26(10): 1330-5.
8. Liton PB, Gonzalez P. Stress response of the trabecular meshwork. *Journal of glaucoma*. 2008; 17(5):378-9.
9. Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA, Llesuy SF. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *American journal of ophthalmology*. 2004;137(1):62-9.
10. Erdurmus M, Yagci R, Atis Ö, Karadag R, Akbas A, Hepsen IF. Antioxidant status and oxidative stress in primary open angle glaucoma and pseudoexfoliative glaucoma. *Current eye research*. 2011;36(8):713-8.
11. Ganea E, Harding JJ. Glutathione-related enzymes and the eye. *Current eye research*. 2006;31(1):1-11.
12. Johansson LH, Borg LH. A spectrophotometric method for determination of

- catalase activity in small tissue samples. *Analytical biochemistry*. 1988;174(1):331-6.
13. Arthur J, Boyne R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life sciences*. 1985; 36(16): 1569-75.
14. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967; 70(1): 158-69.
15. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods in enzymology*. 1985; 113:484-90.
16. Jakoby WB. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1978; 46:383-414.
17. Riley M. Physiologic neutralization mechanisms and the response of the corneal endothelium to hydrogen peroxide. *The CLAO journal: official publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists, Inc*. 1989; 16(1 Suppl): S16-21; discussion S-2.
18. Majsterek I, Malinowska K, Stanczyk M, Kowalski M, Blaszczyk J, Kurowska AK, et al. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Experimental and molecular pathology*. 2011; 90(2):231-7.
19. Engin KN, Yemişçi B, Yiğit U, Ağaçhan A, Coşkun C. Variability of serum oxidative stress biomarkers relative to biochemical data and clinical parameters of glaucoma patients. *Molecular vision*. 2010;16:1260-1.
20. Ghanem AA, Arafa LF, El-Baz A. Oxidative stress markers in patients with primary open-angle glaucoma. *Current eye research*. 2010;35(4):295-301.
21. Goyal A, Srivastava A, Sihota R, Kaur J. Evaluation of oxidative stress markers in aqueous humor of primary open angle glaucoma and primary angle closure glaucoma patients. *Current eye research*. 2014;39(8):823-9.
22. Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Progress in retinal and eye research*. 2006;25(5):490-513.
23. Li G, Luna C, Liton PB, Navarro I, Epstein DL, Gonzalez P. Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Molecular vision*. 2007;13:2282-3.
24. Yildirim Ö, Ateş NA, Tamer L, Öz Ö, Yılmaz A, Atik U, et al. May glutathione S-transferase M1 positive genotype afford protection against primary open-angle glaucoma? *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2005; 243(4): 327-33.
25. Hayes J, Strange R. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress *Free Radic Res* 1995; 22: 193-207.